

(今村 政信) 論文内容の要旨

主 論 文

(Ternary Complex of Plasmid DNA Electrostatically Assembled with Polyamidoamine Dendrimer and Chondroitin Sulfate for Effective and Secure Gene Delivery)

(ポリアミドアミン dendrimer とコンドロイチン硫酸を静電的に組織化させたプラスミド DNA 三重複合体による有効で安全な遺伝子デリバリー)

(今村政信、兒玉幸修、樋口則英、神田紘介、中川博雄、室高広、中村忠博、北原隆志、佐々木均)

(Biol. Pharm. Bull. 37 巻4号 552-559 2014年)
[8 ページ]

長崎大学大学院医歯薬学総合研究科医療科学専攻
(主任指導教員：佐々木 均教授)

緒 言

近年、癌、感染症、免疫不全などの疾患に対し、遺伝子や核酸医薬品による治療が期待されている。しかし、遺伝子や核酸医薬品は、体内で容易に分解を受け、細胞内への取り込みが難しい。したがって、これらの治療には、効率的な遺伝子ベクターが不可欠である。特に、遺伝子を細胞内へ取り込ませるためのアプローチとして、カチオン性脂質やカチオン性ポリマーを用いた非ウイルスベクターの開発が進んでいる。

我々は新規化合物である dendrimer に注目した。Polyamidoamine (PAMAM) dendrimer は、遺伝子ベクターとして有用性が報告されている。しかし、PAMAM dendrimer 複合体は、細胞障害性、赤血球凝集などの毒性も有している。そこで我々は PAMAM dendrimer と plasmid DNA (pDNA) の複合体 (PAMAM dendriplex) に、医薬品に用いられる chondroitin sulfate (CS) を静電的に結合させることにより、高い安全性と遺伝子導入効率を有する新しい遺伝子ベクター (CS complex) の開発を試みた。

方 法

ルシフェラーゼをコードした pDNA をモデル核酸医薬品として用いた。pDNA に第5世代の PAMAM dendrimer を添加し PAMAM dendriplex を調製した。さらに、PAMAM dendriplex に CS を添加し CS complex を作成した。各複合体の粒子径、表

面電荷を Zetasizer Nano ZS で測定した。また、pDNA 流出の有無をアガロースゲル電気泳動で確認した。

マウスメラノーマの培養細胞 (B16-F10) を用い、各複合体の遺伝子導入効率を luciferase assay により測定し、細胞障害性を WST-1 assay で評価した。また、各複合体をマウス血液から分離した赤血球に添加し血液凝集を観察した。さらに、取り込み阻害剤が遺伝子発現に及ぼす影響を調べた。阻害剤には、クラスリン介在性エンドサイトーシス阻害剤 (Chlorpromazine)、カベオラ介在性エンドサイトーシス阻害剤 (Genistein)、マクロピノサイトーシス阻害剤 (Amiloride) を用いた。

ddy マウスの尾静脈より各複合体を投与し、6 時間後の各臓器 (肝臓、腎臓、脾臓、心臓、肺) における遺伝子発現を luciferase assay で測定した。

結 果

調製した PAMAM dendriplex は 65 nm 未満の微粒子で正電荷を示した。B16-F10 細胞を用いた遺伝子導入実験では、pDNA の電荷 1 に対し PAMAM デンドリマーの電荷 4 以上で最大のルシフェラーゼ活性が得られた。しかし、PAMAM dendriplex では高い細胞毒性が認められた。そこで PAMAM dendriplex に様々な電荷比で CS を添加し CS complex を作成した。CS の電荷比 12 以上で 74 nm 未満の負電荷の安定な微粒子が形成され、高い遺伝子導入効率を示した。また、PAMAM dendriplex は血液凝集を示したが、CS complex では血液凝集が認められなかった。B16-F10 細胞に対する CS complex の遺伝子発現に対する取り込み阻害剤の影響を調べた結果、Chlorpromazine と Genistein により有意な減少が観察された。

複合体をマウスに尾静脈内に投与した結果、いずれも脾臓で高い遺伝子発現が認められ、特に CS complex では PAMAM dendriplex に比べ、有意に高い発現を示した。

考 察

PAMAM dendriplex は、培養細胞に対し高い遺伝子導入効率を示したが、強い細胞障害と血液凝集を示した。表面の正電荷による細胞膜への強い相互作用によるものと考えられる。一方、CS complex は表面が負電荷を示すことから、細胞障害性や血液凝集を示さなかった。一般的に、アニオン性の遺伝子ベクターの遺伝子導入効率は、カチオン性の遺伝子ベクターに比べ低いことが知られている。しかし、CS complex は、PAMAM dendriplex と同等の高い遺伝子導入効率を示した。この高い遺伝子導入効率は、取り込み阻害剤の遺伝子発現に対する影響の結果から、CS の特異的な取り込み機構によるものと考えられた。CS complex は、主にクラスリン介在性エンドサイトーシスにより細胞内へ取り込まれており、PAMAM dendriplex とは異なる取り込み機構であることが示された。

PAMAM dendriplex および CS complex をマウスに尾静脈内投与した結果、脾臓で選択的に高い遺伝子発現を示した。CS complex の遺伝子発現は、PAMAM dendriplex より有意に高かった。今回開発した CS complex は安全性が高く、脾臓で極めて高い遺伝子発現を示すことから、遺伝子ワクチンなどのベクターとして臨床応用が期待できる。

(備考) ※日本語に限る。2000 字以内で記述。A4 版。